

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У РЕГЕНЕРАНТОВ
CUPRESSUS MACROCARPA ПРИ МИКРО-РАЗМНОЖЕНИИ *IN VITRO*
В ПРИСУТСТВИИ ЦИТОКИНИНОВ**

В.В. Самойлович, Т.П. Кунаховец, 3 курс

Т.В. Герасимович, младший научный сотрудник

Научный руководитель – О.А. Кудряшова, научный сотрудник

Научный консультант – А.А. Волотович, к.б.н., доцент

Полесский государственный университет

Массовое размножение представителей отдела Хвойные представляет особый практический интерес, в силу особенностей их размножения, с одной стороны, а также, с другой стороны, из-за возможности получения генетически однородного, элитного посадочного материала, при использовании клеточных технологий размножения *in vitro*.

Разработка технологического регламента размножения растений отдела Хвойные проводилась в 2012–2013 гг. на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве учреждения образования “Полесский государственный университет” по заказу Министерства лесного хозяйства Республики Беларусь, при участии государственного учреждения “Республиканский лесной селекционно-семеноводческий центр” (договор № 183 от 04.07.2012 г.). В качестве одного из модельных объектов данной разработки выступали растения кипариса крупноплодного *Cupressus macrocarpa* [1, 2].

В настоящей работе приведены результаты изменчивости высоты регенерантов (ВР), количества побегов (КП) и сырого веса регенерантов (СВР) *Cupressus macrocarpa in vitro* в присутствии разных концентраций 6-бензиламинопурина (6-БАП) и зеатина.

В качестве микро-, макро-солевой основы агаризованной, питательной среды для размножения введенных в культуру *in vitro* регенерантов *Cupressus macrocarpa* использовали среду Андерсона [3], дополненную цитокининами по схеме:

1. Контроль 1 – среда Андерсона без фитогормонов ($pH=4,8\div5,0$)
2. Контроль 2 – среда Андерсона без фитогормонов ($pH=5,6\div5,8$)
3. Среда Андерсона с 1,0 мг/л 6-БАП ($pH=4,8\div5,0$)
4. Среда Андерсона с 1,0 мг/л 6-БАП ($pH=5,6\div5,8$)
5. Среда Андерсона с 0,5 мг/л 6-БАП ($pH=4,8\div5,0$)
6. Среда Андерсона с 0,5 мг/л зеатина ($pH=4,8\div5,0$)

Кислотность (pH) питательной среды перед автоклавированием составляла 5,0–5,2. Автоклавирование питательной среды осуществлялось на протяжении 25 мин при температуре $+121^{\circ}C$.

6-БАП растворяли в 1н растворе соляной кислоты HCl и добавляли в исследуемых концентрациях (0,5; 1,0 мг/л) в питательную среду до автоклавирования. Зеатин растворяли в 0,5н растворе соляной кислоты HCl и добавляли в стерильную среду после автоклавирования в концентрации 0,5 мг/л, при этом pH питательной среды снижалось до оптимальной величины 4,8.

Учет анализируемых признаков проводили через 5 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре $+25^{\circ}C$, фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч, освещенности 4000 лк (2 люминесцентных лампы OSRAM L36W/76 Natura), относительной влажности воздуха 70%.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [4], с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [5]. Двухфакторный дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе статистического анализа AB-Stat 1.0, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [6].

Результаты исследований приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Изменчивость количественных признаков у регенерантов *Cupressus macrocarpa*

Состав среды	pH	ВР	КП	СВР
АН (без фитогормонов)	4,8÷5,0	0,92±0,05	1,50±0,16	0,0183±0,0015
АН (без фитогормонов)	5,6÷5,8	0,80±0,04	1,37±0,14	0,0171±0,0010
АН+ВАР _{1,0}	4,8÷5,0	0,53±0,02**	2,10±0,19	0,0603±0,0040**
АН+ВАР _{1,0}	5,6÷5,8	0,49±0,02**	2,09±0,17	0,0418±0,0030**
АН+ВАР _{0,5}	4,8÷5,0	0,55±0,02**	2,44±0,13*	0,0408±0,0027**
АН+Z _{0,5}	4,8÷5,0	0,72±0,02*	2,66±0,16**	0,0349±0,0018**
НСР ₀₅		0,18	0,61	0,0099
НСР ₀₁		0,28	0,95	0,0154

Примечания. АН – среда Андерсона; ВАР – 6-бензиламинопури; Z – зеатин; ВР – высота регенерантов, см; КП – количество побегов; СВР – сырой вес регенерантов; НСР – наименьшая существенная разница при $P<0,05$ (НСР₀₅) или при $P<0,01$ (НСР₀₁)

* – достоверно отличается от контроля при $P<0,05$

** – достоверно отличается от контроля при $P<0,01$

Таблица 2 – Однофакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков у регенерантов *Cupressus macrocarpa*

ИВ	Df	ВР		КП		СВР	
		СК	ДВ	СК	ДВ	СК	ДВ
Общее	11	0,036	100	0,273	100	0,0001	100
Фактор А	5	0,072**	91	0,541*	90	0,0010**	96
Повторности	1	0,011	3	0,020	1	0,0001	1
Случайные отклонения	5	0,005	6	0,056	9	0,0001	3

Примечания. ИВ – источник варьирования; df – число степеней свободы; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – фитогормональный состав среды на микро-, макро-солевой основе Андерсона

При повышении значений pH среды показатели анализируемых признаков ухудшались. Так на среде Андерсона без фитогормонов наблюдалась тенденция уменьшения высоты регенерантов, количества побегов и сырого веса регенерантов в 1,2 раза; в 1,1 раза и в 1,07 раза, соответственно. В присутствии 1 мг/л 6-БАП показатели анализируемых признаков уменьшались в 1,1 раза; в 1,01 раза и в 1,4 раза, соответственно (табл. 1).

В присутствии фитогормонов происходило достоверное (в большинстве случаев при $P<0,01$) снижение высоты регенерантов. В вариантах с 0,5 мг/л зеатина высота регенерантов достоверно уменьшалась в 1,3 раза, а в присутствии 0,5÷1,0 мг/л 6-БАП – в 1,6–1,7 раза. Установлена тенденция уменьшения показателей признака с ростом концентрации 6-БАП. При равных концентрациях зеатина и 6-БАП – 0,5 мг/л – высота регенерантов в присутствии зеатина была больше в 1,3 раза (табл. 1).

В присутствии фитогормонов происходило достоверное в случае 0,5 мг/л зеатина (или 6-БАП) увеличение в 1,8 раза (или в 1,6 раза) количества побегов у регенерантов, по сравнению с контролем (табл. 1). Установлена закономерная тенденция уменьшения показателей признака с ростом концентрации 6-БАП.

Анализ изменчивости сырого веса регенерантов указывает на достоверное при $P<0,01$ увеличение в 1,9–3,3 раза показателей признака в присутствии фитогормонов, по сравнению с контролем (табл. 1). При этом с увеличением концентрации 6-БАП в пределах 0,5÷1,0 мг/л показатели сырого веса регенерантов увеличивались в 2,2–3,3 раза, по сравнению с контролем, а в присутствии 0,5 мг/л зеатина – в 1,9 раза. На средах с зеатином и 6-БАП в концентрации по 0,5 мг/л, сырой вес регенерантов в присутствии 6-БАП был выше в 1,2 раза по сравнению с регенерантами на среде с зеатином (табл. 1).

Однофакторный дисперсионный анализ установил достоверное (при $P<0,01$ и $P<0,05$) влияние фитогормонального состава среды на изменчивость всех анализируемых признаков – высоты и количества побегов, а также сырого веса регенерантов, с долей влияния фактора 91%, 90% и 96%, соответственно (табл. 2).

Таким образом, для размножения *Cupressus macrocarpa in vitro* наиболее оптимальным является сочетание среды Андерсона с 0,5 мг/л 6-БАП, либо с 0,5 мг/л зеатина при pH=4,8–5,0. При этом по отношению к контролю показатели количества побегов достоверно увеличиваются в 1,6–1,8 раза.

Список использованных источников

1. Кунаховец Т.П. Анализ изменчивости количественных признаков у регенерантов *Cupressus macrocarpa in vitro* / Т.П. Кунаховец, В.В. Самойлович, О.А. Кудряшова, А.А. Волотович // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2013. – № 1. – С. 31–37.
2. Кунаховец Т.П. Анализ изменчивости количественных признаков у кипариса крупноплодного *Cupressus macrocarpa in vitro* / Т.П. Кунаховец, В.В. Самойлович, О.А. Кудряшова, Е.В. Сахвон, А.А. Волотович, О.Ю. Артемчук, Л.А. Жизневская // Сборник тезисов Международной научно-практической конференции “Клеточная биология и биотехнология растений”. – Минск, 13-15 февраля 2013 г. – С. 213.
3. Trigiano R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М., 1985. – 351 с.
5. Боровиков В.П. STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – СПб., 2001. – 650 с.
6. Анощенко Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Анощенко // Генетика. – М.: Наука, 1994. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.